

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 05092928 A

(43) Date of publication of application: 18.04.93

(51) Int. Cl

A61K 37/24

(21) Application number: 03278252

(22) Date of filing: 30.09.91

(71) Applicant: SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(72) Inventor: SASAKI RYUZO  
UEDA MASAJI

(54) THERAPEUTIC AGENT FOR DYSPNEA

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a therapeutic agent for dyspnea capable of raising the intracellular calcium level of neurons, enhancing choline acetyltransferase activity and preventing, improving or treating Alzheimer type dyspnea.

CONSTITUTION: A therapeutic agent for dyspnea containing erythropoietin(EPO) protein which is one kind of cytokinin and a hematopoietic factor, preferably the EPO or EPO mutant protein prepared by a genetic engineering technique as an active ingredient. The

above-mentioned therapeutic agent is a preventive, improving or therapeutic agent for Alzheimer type dyspnea in the dosage form of preferably a direct infusion into intracranial septal areas. The preventive, improving and therapeutic agent acts as a neurotrophic factor for neurons and has the preventive, improving and therapeutic actions on the dyspnea. Since toxicity is low, the agent can safely be used. Furthermore, although the dose of the above-mentioned active ingredient can suitably be changed according to the extent of damage, it is about 1000-10000 IU at a time for an adult.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-92928

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 37/24

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

AAM

8314-4C

審査請求 未請求 請求項の数3(全5頁)

(21)出願番号

特願平3-278252

(22)出願日

平成3年(1991)9月30日

(71)出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72)発明者 佐々木 隆造

京都府左京区田中東高原町14

(72)発明者 上田 正次

埼玉県川越市今福1672-1 メゾンむさし  
野719

(74)代理人 弁理士 藤野 清也

(54)【発明の名称】 記憶障害改善治療剤

(57)【要約】

【構成】 エリスロポエチン蛋白質を有効成分として含有するアルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤

【効果】 神経細胞の細胞内カルシウム濃度を上げ、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性を高めてアルツハイマー型記憶障害を予防・改善あるいは治療することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 エリスロポエチン蛋白質を有効成分として含有するアルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤。

【請求項2】 エリスロポエチン蛋白質が遺伝子工学的手法によって作製されたエリスロポエチンまたはエリスロポエチンミュテイン蛋白質である請求項1記載の予防・改善・治療剤。

【請求項3】 剤型が脳内中隔野直接注入剤である請求項1または2に記載の予防・改善・治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、サイトカインの一種、造血因子であるエリスロポエチン（以下EPOと略す）蛋白質を有効成分として含有するアルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 EPOは、分子量30～40kDaの高度に糖付加された蛋白質で赤血球産生を促進する造血因子として発見され、すでにその全アミノ酸配列が明かにされている [Jacobs et al, Nature, 313, 806-810 (1985)]。また、ヒト・EPOは、遺伝子工学的手段により高純度のものが大量に生産され貧血治療薬としてすでに応用されている [Urabe et al, Int. J. Cell Cloning, 6, 179-191 (1988)]。EPOの作用は、EPOの標的細胞表面に存在するEPOレセプターを介して行われており、EPOレセプターは、サイトカインスパーファミリーに属することが明かにされている [D'Andrea et al, J. Clin. Invest., 86, 681-687 (1990)]。中枢神経障害修復の観点に立ち、サイトカインの神経栄養因子としての作用に関する研究も近年活発に行われ、IL-3が培養ラット中隔野神経細胞やコリン作動性ニューロン由来PC-12細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT活性）を高めること [田平武他, 平成2年度ヒューマンサイエンス研究報告、第3分野 3-4-1-A, 288-302 (1991)] や、IL-6がPC-12細胞の樹状突起の進展を促進すること [鳥居邦夫, 代謝, 26, 臨時増刊号, 脳代謝とその異常, 195-201 (1989)] が報告されている。

【0003】 一方、アルツハイマー病患者においては、脳や髄液中のChAT活性の著しい低下が認められる [中村重信, 蛋白質核酸酵素, 36, 30-40 (1991)]。即ち、アルツハイマー型痴呆病のような中枢退行性疾患においては、前脳基底部（中隔野、ブロッカー対角帯およびマイネルト基底核）のコリン作動性神経細胞の変性脱落により、神経伝達物質であるアセチルコリンが生産されず顕著な低下が惹起される。アセチルコリンの低下が、アルツハイマー型痴呆病の記憶学習障害の原因と考えられている [Whitehouse et al, Science, 215, 1237-1239 (1982); Coyle et al, Science, 219, 1184-1195 (1983)]。実験的には、ラットの前脳基底部のコリン作動性神経細胞を破壊するとアセチルコリン量の低下と記憶障害が惹起されることが報告されている [Helper et al, J Neurosci, 5, 866-873 (1985)]。1980年代に入って、海馬の長期増強と学習・記憶の相関が注目され、細胞内カルシウムの上昇がカルモジュリン依存性キナーゼないしCキナーゼを介して長期増強を誘導することによって脳を活性化すると考えられている [中川八郎, 代謝, 26, 臨時増刊号, 脳代謝とその異常, 37-44 (1989)]。

【0004】 以上のことからコリン作動性神経細胞に作用してChAT活性を上昇させる薬物（例えばNGF）や神経細胞内カルシウム濃度を上昇させる物質は、アルツハイマー型痴呆症のような中枢退行性疾患に対して予防・治療の作用を有すると考えられている。尚、近年、高齢化に伴い急増する老人性疾患の中でも、とりわけ老人性アルツハイマー型痴呆症は、有効な治療法がなく、社会問題となり、その有効な治療薬の開発が切望されている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、神経細胞に作用し、ChAT活性を上昇させる薬剤をアルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療に応用するものである。すなわち、本発明の課題は、ChAT活性を上昇させてアルツハイマー型記憶障害を予防・改善あるいは治療する薬剤を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記の技術背景に立ち、サイトカインの中から赤血球造血因子であるEPOに着目し、ヒト神経芽細胞株（コリン作動性ニューロン由来）PC-12細胞に対するEPOの作用を精査したところ、EPOがPC-12細胞に作用し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、細胞内ChAT活性を上昇させる作用を有することを見出し、本発明を完成了。

【0007】 すなわち、本発明は、EPO蛋白質を有効成分として含有するアルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤に関する。上記EPO蛋白質は、EPO活性、即ち赤血球前駆細胞の分化・増殖作用を有する物質であればいずれでもよい。このようなEPO蛋白質としては、天然のヒト尿由来のEPO蛋白質でもよく、また、遺伝子工学的手法によって製造したEPO蛋白質、あるいは、ミュテインでもよい。EPOミュテインとしては、例えば、特開平3-151399号公報に記載したミュテインが挙げられる。上記EPOミュテインとしては、もとの糖蛋白質のペプチド鎖のAsnがGlnに変異し、結合するN結合型糖鎖の結合数が変異したものがある。また他に、アミノ酸変異としては、特開平2-59599号公報、特開平3-72855号公報記載のものが挙げられる。即ち、EPOの有するEPOレセプタ

一への作用特性を失わない限り、アミノ酸の変異、消失、付加は何個でもよい。

【0008】本発明のEPOは貧血治療薬としてすでに臨床に応用されており、特筆すべき副作用も報告されていない。このように、治療剤は低毒性であるので、安全に使用することができる。EPOはPC-12細胞に作用し細胞中のアセチルコリン含量を高める作用があるので脳の神経細胞に作用して、アセチルコリン量を上昇させる作用があり、アルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療に用いることができる。あるいは、脳神経細胞に作用して神経細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を調節し長期増強を誘導する。本治療剤は、公知の製剤学的製造法に準じ薬学的に許容しうる液体に1万~10万単位で加え分散させて調製することができる。また、得られる溶液を凍結乾燥し、用時生理食塩水に溶解して用いる用時溶解型としてもよい。さらに、安定化剤として公知の生物学的製剤に使用される一般的薬剤、例えば、ヒト血清アルブミンや糖を添加することにより安定に使用することができる。さらに、他の配合剤として、アミノ酸や、脂肪酸を加えることもできる。

【0009】本記憶障害の改善・治療剤は、投与の方法として直接脳組織内に投与することにより、アルツハイマー型記憶障害の改善・治療を促進させることができる。投与部位としては脳内中隔野に直接注入することが望ましい。また、投与量は障害の程度によって適宜変更しうるが、成人の場合、一回あたり1000~10000IU程度を投与する。

【0010】次に実施例及び実験例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。しかし、本発明はこれらの実施例及び実験例に限定されるものではない。

#### 【実施例1】

アルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤の製造  
人尿由来EPO 6,000,000IU  
ヒト血清アルブミン 2,500mg  
注射用蒸留水にて全量を11とする。この組成を1mlずつアンプルに充填し、滅菌を行い、EPO 6000IU注射液を作成した。

#### 【0011】

#### 【実施例2】

アルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤の製造  
遺伝子組換EPO 120,000,000IU  
ヒト血清アルブミン 2,500mg  
注射用蒸留水にて全量を11とする。この組成液をミリポアフィルターによりろ過し、滅菌バイアル瓶に1mlずつ分注し、凍結乾燥後密封した。このバイアル瓶の内容を1mlの生理食塩水に溶解することにより、120,000IUの注射液を作成した。

#### 【0012】

#### 【実施例3】

#### \* アルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤の製造

遺伝子組換EPO原液 2.44ml (2,100,000IU)

20%ヒト血清アルブミン 7.75ml

注射用蒸留水 144.81ml

全量を混合溶解後、ミリポアフィルターでろ過し、滅菌バイアル瓶に0.5mlづつ充填し、凍結乾燥後密封した。本バイアルは6,000IUに相当する。

【0013】以下に本発明の治療剤を用いた実験例を示す。

#### 【実験例1】

#### 神経細胞由来PC-12細胞のEPOレセプター測定

レセプターアッセイ並びにレセプターの分子サイズの測定はSasakiらの方法 [Eur. J. Biochem., 168, 43-48 (1987)] に従い実施した。PC-12細胞 (ATCC CRL-1721) 1~8×10<sup>6</sup>細胞/150μl、EPO濃度0.5~10nMとし、15℃、2~3時間反応を行った。PC-12細胞のEPOレセプターのEPOに対する結合親和常数はKd = 8nM、レセプター数は細胞あたり約1000個と算出された。また、SDS電気泳動法によるEPOレセプターの分子サイズは、約66kDaと算出された。

#### 【0014】

#### 【実験例2】

#### PC-12細胞のEPOレセプターの特性

実験例1と同様に、PC-12細胞のEPOレセプターに対するEPOの親和性と、糖、キレート剤、サイトカイン類、ホルモンの結合阻害性を測定した。測定は<sup>125</sup>I-rHuEPOを用い、この特異的結合に対する阻害能を測定した。特異的結合は、無添加時の<sup>125</sup>I-EPOの結合阻害率を100とした相対率で表した。数値が小さいほど<sup>125</sup>I-EPOとPC-12細胞の結合阻害が大きい。すなわち添加した物質のEPOレセプターへの結合親和力が強い。このように測定したPC-12細胞のEPOレセプターの特性を表1~表3に記載した。EPOレセプターは、ヒトEPO、N結合型糖鎖結合部位を欠く変異EPO並びにマウスEPOを認識した(表1)。表1に示したrHuEPOとは遺伝子組換EPOであり、rHuEPO (N-グリカナーゼ処理)は、遺伝子組換EPOを津田らの方法(Tsuda et al., J. Biochem, vol. 188, 405-411, 1990)に従って調製したものであり、NQ123は特開平3-151399号公報に開示された方法に従い調製したN結合型糖鎖を一分子当たり3本を欠くrHuEPOミュテインである。また、他の各種サイトカイン(表3)および糖(表2)は、EPOとレセプターの結合に影響しなかった。即ち、PC-12細胞のEPOレセプターは、EPOと特異的に結合した。

#### 【0015】

#### 【表1】

PC-12細胞に対する各種EPO結合の特異性

添加物	添加量 (ng in 150 μl)	<sup>125</sup> I-rHuEPOの 特異的結合 (%)
無添加	—	100
rHuEPO	1.5	1.6
rHuEPO (N-グリカーゼ処理)	1.5	2.9
NQ123 (N結合型糖鎖結合		
部位を欠くrHuEPOミュテイン)	1.5	2.1
ラットEPO	1.5	2.3

\* rHuEPO: 遺伝子組換ヒトエリスロポエチン

\* が強い。

\* <sup>125</sup>I-rHuEPOの特異的結合は、無添加時の<sup>125</sup>I-EPOと

【0016】

PC-12細胞の結合量の相対値であらわした。数値が

【表2】

小さいほど添加物質のEPOレセプターへの結合親和力\*

## PC-12細胞とEPOの結合に対する糖、キレート剤の影響

添加物	添加量 (mM)	<sup>125</sup> I-rHuEPO の 特異的結合 (%)
なし	—	100
N-アセチルガラクトサミン	1.0	105
ガラクトース	1.0	95
EDTA (エチレンジアミンテトラ酢酸塩)	4.0	98
EGTA (エチレングリコール・ビス・ベータ・ アミノエチルエーテルN N N' N'-4酢酸塩)	4.0	91

\* <sup>125</sup>I-rHuEPOとPC-12細胞の特異的結合量を10~30%親和力が強い。

0とした相対値で表した。数値が小さいほど結合阻害が 【0017】

おおきい。すなわち添加物のEPOレセプターへの結合※ 【表3】

## PC-12細胞に対する各種サイトカイン、ホルモンの結合特異性

添加物	添加量 (ng in 150 μl)	<sup>125</sup> I-rHuEPO の 特異的結合 (%)
無添加	—	100
rHuEPO	1.25	1.6
ヒト・IL-2	5.0	1.02
サル・IL-3	5.0	1.17
ヒト・IL-6	2.00	9.2
マウス・G-CSF	5.00	9.2
ヒト・GM-CSF	5.00	8.2
ヒト・EDF	5.00	1.00
ヒト・TNF	5.00	9.9
ヒト・HGF	5.00	1.02
マウス・NGF	5.00	9.1
ヒト・EGF	5.00	9.7
ヒト・インシュリン	1.000	1.02

\*<sup>125</sup> I-rHuEPOの特異的結合は、無添加時の<sup>125</sup> I-rHuEPOとPC-12細胞の結合量の相対値で表した。数値が小さいほど添加物質のEPOレセプターへの結合親和力が強い。

## 【0018】

## 【実験例3】

rHuEPOのPC-12細胞内カルシウム濃度上昇活性の測定

細胞内カルシウム濃度の測定は、Grynkiewiczら] J. Bi\*10

PC-12細胞カルシウムレベルに対するEPOの効果

添加物	添加量	細胞内カルシウム濃度 の相対増加率 (%) (対 basal level)	測定回数
EPO	0.3単位/ml	143±40	12
〃	3 〃	149±46	12
〃	10 〃	160±48	12
〃	20 〃	169±45	7
EPO (20年単位/ml) 添加後EGTA(1mM) を添加		126±9	3
プラジキニン	10 μM	169±40	10

以上の実験の結果、EPOは神経細胞の細胞内カルシウム濃度を上げ、ChAT活性を上昇させることができた。

## 【0020】

【発明の効果】本発明のEPO蛋白質を有効成分とする

\* o. Chem., 260, 3440-3450 (1985) 方法に準じ、PC-12細胞 $5 \times 10^6$  cells/mlで行った。EPO 20単位/mlのPC-12細胞内カルシウム濃度の上昇は、プラジキニン 10 μM 添加時の効果に匹敵した。EPO添加量と細胞内カルシウム濃度を表4に示した。

## 【0019】

## 【表4】

製剤は、神経細胞に対し神経栄養因子として働き、アルツハイマー型記憶障害の予防、改善、治療作用を有するもので、アルツハイマー型記憶障害の予防・改善・治療剤として有利に用いることができる。